

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-302689
(P2000-302689A)

(43)公開日 平成12年10月31日(2000. 10. 31)

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード*(参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-------------|
| A 6 1 K 38/22 | | A 6 1 K 37/24 | |
| 9/08 | | 9/08 | |
| 47/16 | | 47/16 | |
| A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 |

審査請求 有 請求項の数21 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願2000-97633(P2000-97633)
(62)分割の表示 特願平9-123169の分割
(22)出願日 平成9年4月25日(1997. 4. 25)

(31)優先権主張番号 特願平8-131226
(32)優先日 平成8年4月26日(1996. 4. 26)
(33)優先権主張国 日本(J P)
(31)優先権主張番号 特願平8-303956
(32)優先日 平成8年10月30日(1996. 10. 30)
(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000003311
中外製薬株式会社
東京都北区浮間5丁目5番1号
(72)発明者 山崎 忠男
東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製
薬株式会社内
(72)発明者 森田 俊存
東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製
薬株式会社内
(72)発明者 永井 広史
東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製
薬株式会社内
(74)代理人 100089705
弁理士 社本 一夫 (外5名)

(54)【発明の名称】 エリスロポエチン溶液製剤

(57)【要約】

【課題】 安定化剤として実質的にタンパク質を含有しない、凍結乾燥製剤に代わるEPOの製剤を提供する。

【解決手段】 安定化剤として、トリプトファン及びセリン、ならびにその塩から選択される1または2以上のアミノ酸を含む、エリスロポエチン溶液製剤、並びに、尿素を含まず、安定化剤として、ロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸及びアルギニンならびにその塩から選択される1または2以上のアミノ酸を含む、エリスロポエチン溶液製剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 安定化剤として、トリプトファン及びセリン、ならびにその塩から選択される1または2以上のアミノ酸を含む、エリスロポエチン溶液製剤。

【請求項2】 尿素を含まず、安定化剤として、ロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸及びアルギニンならびにその塩から選択される1または2以上のアミノ酸を含む、エリスロポエチン溶液製剤。

【請求項3】 安定化剤が、L-トリプトファン及びL-セリンならびにその塩から選択される1または2以上のアミノ酸である、請求項1に記載の溶液製剤。

【請求項4】 安定化剤が、L-ロイシン、L-トリプトファン、L-セリン、L-グルタミン酸及びL-アルギニンならびにその塩から選択される1または2以上のアミノ酸である、請求項2に記載の溶液製剤。

【請求項5】 安定化剤が、トリプトファン及び／又はその塩である、請求項1に記載の溶液製剤。

【請求項6】 安定化剤が、アルギニン及び／又はその塩である請求項2に記載の溶液製剤。

【請求項7】 安定化剤として、さらにヒスチジンを含む、前記請求項1～6のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項8】 安定化剤として、さらにL-ヒスチジンを含む、前記請求項1～6のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項9】 アミノ酸の濃度が0.1～40mg/mlである請求項1～8のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項10】 アルギニンの濃度が1～5mg/mlである、請求項2、4及び6～9のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項11】 尿素を含まない、請求項1、3及び5～10のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項12】 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない、請求項1～11のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項13】 界面活性剤をさらに含む請求項1～12のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項14】 界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである、請求項13に記載の溶液製剤。

【請求項15】 界面活性剤がポリソルベート20及び／又は80である、請求項14に記載の溶液製剤。

【請求項16】 塩をさらに含む、請求項1～15のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項17】 塩が塩化ナトリウムである、請求項16に記載の溶液製剤。

【請求項18】 緩衝液に溶解されている、請求項1～17のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項19】 緩衝液がリン酸及び／又はクエン酸である、請求項18に記載の溶液製剤。

【請求項20】 トリプトファン及びセリンならびにそ

の塩から選択される1または2以上のアミノ酸を含む、安定化剤をエリスロポエチン溶液製剤に添加することを、エリスロポエチン溶液製剤の安定化方法。

【請求項21】 尿素を含まず、ロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸及びアルギニンならびにその塩から選択される1または2以上のアミノ酸を含む、安定化剤をエリスロポエチン溶液製剤に添加することを、エリスロポエチン溶液製剤の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はエリスロポエチンの溶液製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】エリスロポエチン（以下においてEPOと記載することもある）は、赤血球系前駆細胞の分化、増殖を促進する酸性糖タンパク質ホルモンであり、主として腎臓から産生される。血液中に最も豊富に存在する赤血球は、一定期間機能した後に脾臓などで破壊される（ヒトでは平均寿命が約120日）が、骨髓から絶えず供給されることによって、正常な状態では末梢の全赤血球数は常に一定に保たれている。EPOはこのような生体の赤血球の恒常性維持において中心的な役割を担っている。

【0003】大量の再生不良性貧血患者の尿から高純度のヒト尿由来EPOが精製されて以来、これを契機に、ヒトEPO遺伝子のクローニングに成功し、現在では遺伝子工学的的方法によって動物細胞で組換えヒトEPOを大量に生産することが可能になった。また、本願出願人はこの精製したEPOの製剤化（凍結乾燥製剤）に成功し、腎性貧血改善剤などとして市場に製品を供給している。

【0004】安定なEPO製剤を市場に供給するための処方設計では、EPOに見られる化学的変化（加水分解、ジスルフィド交換反応など）あるいは物理的変化（変性、凝集、吸着など）を抑制する必要がある。現在市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的変化を抑制するために、安定化剤として一般的に使用されているヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンが添加されている。このうち、ヒト血清アルブミンは輸血に依存する血液製剤であり、医薬品適正使用の面からその添加の可否が問われている。また、前述のアルブミンやゼラチン以外のタンパク質を安定化剤として添加することに関しても、ウィルスのコンタミなどの危険性を完全に回避することは困難である。

【0005】また、ペプチド医薬品製剤の安定化を図るために、凍結乾燥を施している場合が多いが、凍結乾燥は、工業的には生産コストの増大を招き、さらに機械トラブルによる危険性の増大を伴うことになる。

【0006】

【発明が解決すべき課題】以上の理由から、安定化剤と

してタンパク質を含有せず、しかも長期の保存にも安定な凍結乾燥製剤に代わるEPOの製剤が求められている。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤にある種のアミノ酸を添加することにより、ヒト血清アルブミンや精製ゼラチンを含まない安定なEPO溶液製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、安定化剤としてアミノ酸を含むエリスロポエチン溶液製剤を提供する。

【0009】本明細書中で安定化とは、エリスロポエチン溶液製剤を例えば10℃で2年間以上、又は25℃で6ヶ月以上、あるいは40℃で2週間以上保存し、その際にエリスロポエチンの残存率を90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上に保つことを意味する。

【0010】本発明の溶液製剤に使用するEPOは、哺乳動物、特にヒトのEPOと実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法によって得られたものを含む。遺伝子組換え法によって得られるEPOには天然のEPOとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1または複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。本発明におけるEPOは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト尿より種々の方法で抽出し分離精製したもの、遺伝子工学的手法により大腸菌、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。

【0011】本発明で安定化剤として添加するアミノ酸には、遊離のアミノ酸ならびにそのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の溶液製剤には、これらのアミノ酸の1種または2種以上を組み合わせることで添加することができる。好ましいアミノ酸は、D-、L-およびDL-体のロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジンおよびリジンならびにその塩であり、より好ましいのはL-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-リジンならびにその塩である。特に好ましいのは、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-リジンならびにその塩である。最も好ましいのはL-ヒスチジンならびにその塩である。

【0012】本発明の溶液製剤には好ましくは安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない。

【0013】本発明の溶液製剤に添加するアミノ酸の添加量は使用するアミノ酸の種類により、後述する試験方法を用いて好ましい範囲を定めることができる。一般には0.001~50mg/ml、アルギニンでは好まし

くは0.1~40mg/ml、さらに好ましくは1~10mg/mlであり、リジンでは好ましくは0.5~10mg/ml、さらに好ましくは1~10mg/mlであり、ヒスチジンでは好ましくは0.5~10mg/ml、さらに好ましくは1.0~4.0mg/ml、最も好ましくは1.0~2.0mg/mlである。後述するように、L-アルギニン塩酸塩の場合ならびにL-リジン塩酸塩の場合には、遊離のアミノ酸に換算して約1~5mg/ml、L-ヒスチジン塩酸塩の場合には、40℃-2週間加速試験では遊離のアミノ酸に換算して1~10mg/mlで、また25℃-6ヶ月加速試験では0.5~5mg/mlの範囲で最も高いEPO残存率を示した。

【0014】本発明の溶液製剤中に含まれるEPOの量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には100~500000IU/ml、好ましくは200~100000IU/ml、さらに好ましくは750~72000IU/mlである。本発明の溶液製剤は、通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下又は静注）、経皮、経粘膜、経鼻などで投与されるが、経口投与も可能である。

【0015】本発明の溶液製剤には、EPO、アミノ酸の他に、ポリエチレングリコール；デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、シュークロース、ラフィノースなどの糖類；塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩；及び場合によってはグルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール、チオ硫酸ナトリウムなどの含硫還元剤、などの溶液製剤に通常添加される成分を含んでいてよい。好ましい塩は塩化ナトリウムである。さらに、本発明の溶液製剤にはポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルなどの吸着防止剤を添加することが好ましい。特に好ましいポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルは、ポリソルベート20、21、40、60、65、80、81、85であり、最も好ましいのはポリソルベート20及び/又は80である。ポリソルベート20及び/又は80の好ましい添加量は0.01~1mg/ml、さらに好ましくは0.05~0.1mg/mlである。

【0016】本発明の溶液製剤はこれらの成分をリン酸及び/又はクエン酸緩衝液などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって調製できる。リン酸緩衝液は、リン酸一水素ナトリウム-リン酸二水素ナトリウム系が好ましく、クエン酸緩衝液としてはクエン酸ナトリウムの緩衝液が好ましい。本発明の溶液製剤のpHは5.0~8.0、好ましくは6.0~7.0とす

ることが好ましい。

【0017】特開昭64-71818号は、尿素、アミノ酸、非イオン性湿潤剤を含有することを特徴とするヒト蛋白質製剤を開示する。しかし、本発明の溶液製剤は好ましくは尿素を含まない。尿素は例えばエリスロポエチンのような糖鎖タンパク質の長期安定化への寄与が明確でなく、また尿素の分解による生成物とタンパク質との反応が知られており（タンパク質化学3、共立出版、第12章）、このため製剤に悪影響を及ぼすことがあるからである。さらに、一般的には製剤中の添加成分は少ない方がよいと考えられる。

【0018】本発明の溶液製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス容器中に収納されている。容器はアンプル、バイアルまたはディスポーザブル注射器のような規定用量の形状で供給することができ、あるいは注射用バックまたは瓶のような大用量の形状で供給することもできる。

【0019】種々のアミノ酸を含むEPO溶液製剤を調製し、40℃-2週間の加速試験を実施し、試験後の製剤中のEPO含量をRP-HPLC法（逆相高性能液体クロマトグラフィー）によってその添加効果を測定した。その結果、アミノ酸を添加しない溶液製剤に比べて、L-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸ナトリウム、L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩およびL-リジン塩酸塩を添加した溶液製剤に

試験方法

調剤溶液1ml中に以下の成分：

| | |
|------------------------------------|----------|
| EPO | 1500国際単位 |
| 非イオン性界面活性剤 （ポリソルベート80：日光ケミカル社製） | 0.05mg |
| 塩化ナトリウム | 8.5mg |
| アミノ酸（Sigma社製） | 0~40mg |

を含み、10mMリン酸緩衝溶液（和光純薬社製）にてpH6.0に調整した溶液を、5mlのガラスバイアルに1ml充填し、打栓、密封し、溶液製剤に供した。加速試験は同製剤を40℃の恒温槽内に2週間放置した。製剤の評価は、RP-HPLC分析法（WATERS社製）およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法により行った。

実施例1：各種アミノ酸添加のEPO残存率に及ぼす効

おけるEPO残存率の高いことが判明した。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析の結果から、L-アルギニン塩酸塩およびL-ヒスチジン塩酸塩については、加速試験後の製剤中に認められるEPO分解物の生成を抑制する効果があることも確認された。

【0020】さらに、添加効果が認められたアミノ酸のうちで、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩及びヒスチジン塩酸塩について、製剤の安定化に及ぼす添加濃度の影響について検討した。L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩又はヒスチジンを種々の濃度で添加した製剤を調製し、40℃-2週間の加速試験を行った後の製剤中のEPO残存率は、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩のいずれの場合においても濃度が約1~5mg/mlの間で極大になる傾向が認められ、L-ヒスチジン塩酸塩では1~10mg/mlの範囲で最高のEPO残存率を示した。また、L-ヒスチジン塩酸塩を種々の濃度で添加した製剤を調製し、25℃-6ヶ月の加速試験を行った後のEPO残存率は0.5~5mg/mlの範囲で極大を示した。このことから、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩及びL-ヒスチジン塩酸塩には至適添加濃度が存在することが明らかとなった。

【0021】本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。

【0022】

【実施例】

果

以下に記載の各種アミノ酸を添加した溶液製剤を上述の試験方法により調製し、40℃-2週間加速試験を行った後のEPO残存率をRP-HPLC法により算出した。得られた結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

表 1 各種アミノ酸を添加した溶液製剤の加速試験後のEPOCH残存率。

| アミノ酸 | 添加量 (mg/ml) | 40℃・2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量) |
|---------------|-------------|---|
| 無添加 | 0 | 83.9 % |
| L-ロイシン | 10 | 91.5 % |
| L-フェニルアラニン | 10 | 57.8 % |
| L-トリプトファン | 5 | 97.0 % |
| L-セリン | 10 | 85.2 % |
| L-システイン | 10 | 47.1 % |
| L-グルタミン酸ナトリウム | 10 | 93.9 % |
| L-アルギニン塩酸塩 | 10 | 93.5 % |
| L-ヒスチジン塩酸塩 | 10 | 99.7 % |
| L-リジン塩酸塩 | 10 | 95.8 % |

L-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸ナトリウム、L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩およびL-リジン塩酸塩が特に顕著なEPO残存率を示した。

【0024】実施例2：アミノ酸添加濃度のEPO残存率に及ぼす効果

以下に示す各種濃度でL-アルギニン塩酸塩を添加した溶液製剤を上記の試験方法により調製し、40℃・2週間加速試験を行った後のEPO残存率をRP-HPLC法により算出した。得られた結果を表2に示す。

【0025】

【表2】

表 2 L-アルギニン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後のEPOCH残存率。

| アミノ酸 | 添加量 (mg/ml) | 40℃・2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量) |
|------------|-------------|---|
| 無添加 | 0 | 89.6 % |
| L-アルギニン塩酸塩 | 0.1 | 92.7 % |
| | 1 | 96.7 % |
| | 5 | 96.1 % |
| | 10 | 93.6 % |
| | 20 | 92.0 % |
| | 40 | 91.6 % |

また、この結果を図1にグラフとして示す。

【0026】この結果から、L-アルギニン塩酸塩は約1～5mg/mlの範囲で、極大のEPO残存率を示した。

【0027】次いでL-リジン塩酸塩を用いて同様の試

験を行ったときの、L-リジン塩酸塩添加量と加速試験後のEPO残存率を表3に示す。

【0028】

【表3】

表3 L-リジン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後のEPOCH残存率。

| アミノ酸 | 添加量 (mg/ml) | 40℃・2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量) |
|----------|-------------|---|
| 無添加 | 0 | 88.7 % |
| L-リジン塩酸塩 | 0.5 | 93.1 % |
| | 1 | 95.8 % |
| | 5 | 96.3 % |
| | 10 | 90.2 % |

また、この結果を図2にグラフとして示す。

【0029】この結果から、L-リジン塩酸塩の場合も約1～5mg/mlの範囲で、極大のEPO残存率を示した。

【0030】次いでL-ヒスチジン塩酸塩を用いて同様

の試験を行ったときの、L-ヒスチジン塩酸塩添加量と加速試験後のEPO残存率を表4に示す。

【0031】

【表4】

表4 L-ヒスチジン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後のEPOCH残存率

| アミノ酸 | 添加量 (mg/ml) | 40℃・2週間加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量) |
|------------|----------------|---|
| 無添加 | 0 | 91.5% |
| L-ヒスチジン塩酸塩 | 0.5 | 95.5% |
| | 1 | 97.3% |
| | 5 | 98.1% |
| | 10 | 99.7% |

また、この結果を図3にグラフとして示す。L-ヒスチジン塩酸塩では1～10mg/mlの範囲で最高のEPO残存率を示した。

【0032】さらに、以下に示す各種濃度でL-ヒスチジン塩酸塩を添加した溶液製剤を上述の試験方法により

調製し、25℃・6ヶ月加速試験を行った後のEPO残存率をRP-HPLC法により算出した。得られた結果を表5に示す。

【0033】

【表5】

表6 L-ヒスチジン塩酸塩を添加した製剤の加速試験後の EPOCH 残存率

| アミノ酸 | 添加量 [mg/ml] | 25℃・6ヶ月加速試験後の エリスロポエチン残存率 (対初期含量) |
|------------|----------------|---|
| 無添加 | 0 | 93.2% |
| L-ヒスチジン塩酸塩 | 0.5 | 99.3% |
| | 1 | 99.9% |
| | 5 | 97.9% |
| | 10 | 94.1% |

【0034】この結果から、0.5～5mg/mlの範囲で、特に1mg/mlで極大のEPO残存率を示した。

【0035】実施例3：各種アミノ酸添加のEPO分解物に及ぼす効果

各種アミノ酸を添加した溶液製剤を上述の試験方法により調製し、40℃～2週間加速試験を行った後のEPO分解物の生成をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法により検討した。

1) 試料の調製

EPO溶液製剤（実施例1の表1で記載した濃度の各アミノ酸を含む）に上記加速試験後、SDS、グリセリンおよびブロムフェノールブルーを含む1Mトリス-塩酸緩衝液（pH6.8）を加え、60℃で15分加熱し、試料溶液とする。

2) 泳動法

試料溶液10μlについて以下の操作条件で泳動を行う。

【0036】a) 使用機器：スラブ電気泳動装置（バイオラッド製）

b) 泳動ゲル：SDS-PAGE mini 8-16（ポリアクリルアミド濃度8-16%の濃度勾配ゲル）（テフコ製）

c) 泳動温度：25℃

d) 泳動条件：25mA定電流（/ゲル）

3) 染色法（ウェスタンブロット法）

泳動したゲルをポリビニリデンジフルオリド膜へ転写後、抗EPOウサギ抗血清、ビオチン標識抗ウサギIgGや抗体およびビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼを用い、3,3'-ジアミノベンジジン-過酸化水素を基質として発色させる。

4) 結果

得られた結果を図4に示す。アミノ酸無添加製剤（レー

ン2）に比べ、L-グルタミン酸ナトリウム添加製剤（レーン8）、L-アルギニン塩酸塩添加製剤（レーン9）、L-ヒスチジン塩酸塩添加製剤（レーン10）において、分解物生成抑制の顕著な効果が示された。

【0037】

【発明の効果】本発明のEPO溶液製剤はヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどの異種タンパク質を含有しておらず、またウィルスなどのコンタミの恐れのない安全な製剤である。また、アミノ酸はこれらの従来の安定化剤に比べて安価であり、かつ製造工程にかかるコストも凍結乾燥製剤に比べて安価であり、経済的にも有利な製剤であるといえる。さらに、本発明の溶液製剤は、緩衝液に溶解することなくそのまま使用できるため、凍結乾燥製剤に比較して使用時の手間が省ける。これらの種々の利点から本発明の産業上の利用性は大である。

【図面の簡単な説明】

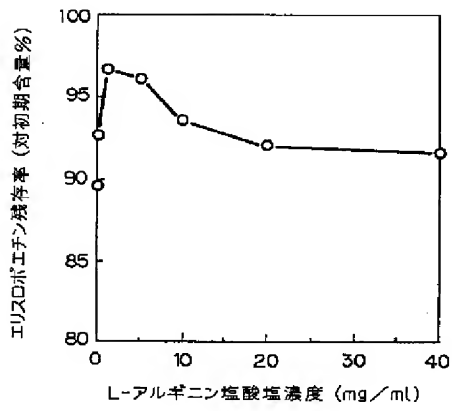
【図1】L-アルギニン塩酸塩濃度とエリスロポエチン残存率の関係を示すグラフである。

【図2】L-リジン塩酸塩濃度とエリスロポエチン残存率の関係を示すグラフである。

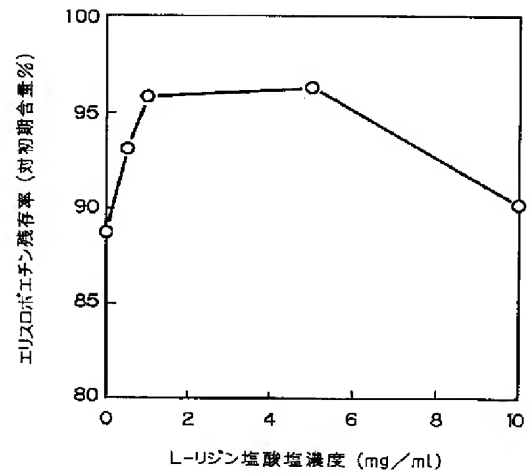
【図3】L-ヒスチジン塩酸塩濃度とエリスロポエチン残存率の関係を示すグラフである。

【図4】各種アミノ酸を添加した製剤の分解物抑制効果を示すSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンである（電気泳動の写真）。レーン1：分子量マーカー、レーン2：アミノ酸無添加製剤、レーン3：L-ロイシン添加製剤、レーン4：L-フェニルアラニン添加製剤、レーン5：L-トリプトファン添加製剤、レーン6：L-セリン添加製剤、レーン7：L-システイン添加製剤、レーン8：L-グルタミン酸ナトリウム添加製剤、レーン9：L-アルギニン塩酸塩添加製剤、レーン10：L-ヒスチジン塩酸塩添加製剤。

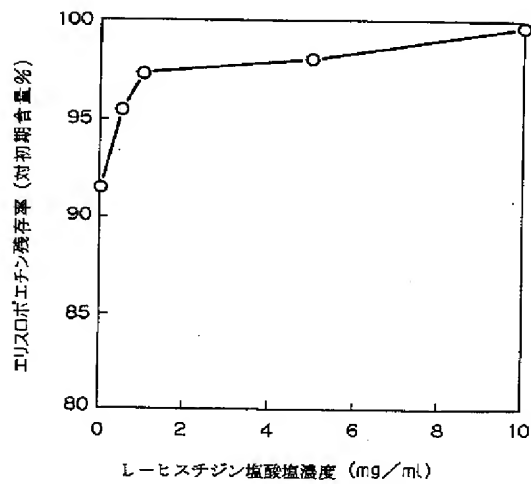
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

